

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Maria Piirsalu

**LSAMP valgü võimalik osalus hipokampusega seotud
neurogeneesis**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Mari-Anne Philips
PhD Kersti Lilleväli

TARTU 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	3
SISSEJUHATUS.....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 Neurogenees arengus.....	5
1.2 Neurogenees täiskasvanud närilistes	5
1.2.1 Inimese neurogenees	8
1.2.2 Täiskasvanu neurogeneesi molekulaarse regulatsiooni mehhanismid	9
1.3 Adhesioonimolekulide osalus neurogeneesis.....	11
1.3.1 <i>Lsmp</i> geen ja limbilise süsteemiga seotud membraanvalk.....	12
1.4 Näriliste neuraalne areng rikastatud keskkonnas	13
2. EKSPERIMENTAALOSA	16
2.1 Töö eesmärgid.....	16
2.2 Materjal ja meetodika.....	16
2.2.1 Katseloomad <i>Lsmp</i> promootorite ekspressiooni iseloomustamiseks	16
2.2.2 RNA eraldamine ja cDNA süntees.....	17
2.2.3 Kvantitatiivne reaalaaja-PCR.....	17
2.2.4 Detailsete piltide tegemine <i>Lsmp</i> 1a ning 1b promootorite ekspressioonist hipokampus.....	19
2.2.5 Katseloomad BrdU kaste jaoks	19
2.2.6 BrdU lahuste valmistamine ja süstimine	21
2.2.7 Perfuseerimine ja ajude eraldamine	21
2.2.8 Immunohistokeemia ja mikroskoopia	21
2.3 Tulemused.....	23
2.3.1 Reaalaaja-PCR tulemused.....	23
2.3.2 <i>Lsmp</i> 1a ja 1b promootorite aktiivsuse muster hipokampus.....	24
2.3.3 Hiirte areng rikastatud- ja standardmajutuses	25
2.3.4 BrdU meetodi optimeerimine.....	26
2.4 Arutelu.....	27
KOKKUVÕTE.....	29
SUMMARY	29
TÄNUAVALDUSED	32
KIRJANDUSE LOETELU	33
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	41

KASUTATUD LÜHENDID

- ADAM – disintegriinid ja metalloproteaasid (*a disintegrin and metalloproteinase*)
- BDNF – ajus toodetav närvikasvufaktor (*brain-derived neurotrophic factor*)
- BrdU – bromodesoksüüridiin (*bromodeoxyuridine*)
- CNTF – tsiliaarne neurotroofne faktor (*ciliary neurotrophic factor*)
- ECM – ekstratsellulaarne maatriks (*extracellular matrix*)
- EGF – epidermaalne kasvufaktor (*epidermal growth factor*)
- FGF-2 – fibroblasti kasvufaktor 2 (*fibroblast growth factor*)
- GABA – gamma-aminobutüraat ehk gamma-aminovõihape (*gamma-amino butyric acid*)
- GDNF – gliiarakus toodetav närvikasvufaktor (*glial cell line-derived neurotrophic factor*)
- GPI – glükofosfatidüül inositol (*glycophosphatidylinositol*)
- Hprt – hüpoksantiin guaniin fosforibosüül transferaas (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*)
- IGF-1 – insuliinilaadne kasvufaktor 1 (*insulin-like growth factor 1*)
- LSAMP – limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (*limbic-system associated membrane protein*)
- Lsmp – limbilise süsteemiga seotud membraanvalku (LSAMPi) kodeeriv geen
- MDD – depressioon (*major depressive disorder*)
- NCAM – neuraalne raku adhesiooni molekul (*neural cell adhesion molecule*)
- NGF – närvikasvufaktor (*nerve growth factor*)
- PSA-NCAM – polüsiaalhappega seotud neuraalne raku adhesiooni molekul (*polysialylated-neural cell adhesion molecule*)
- RMS – rostraalne migratsiooni voog (*rostral migratory stream*)
- SGZ – subgranulaartsoon (*subgranular zone*)
- SVZ – subventrikulaartsoon (*subventricular zone*)
- TA rakud – ülemineku rakud (*transit amplifying cells*)
- TGFα – transformeeriv kasvufaktor alfa (*transforming growth factor alpha*)
- VEGF – vaskulaarne endoteeli kasvufaktor (*vascular endothelial growth factor*)

SISSEJUHATUS

Täiskasvanu neurogenees hipokampuses on seotud neuraaalse plastilisusega ning aitab pidevalt muutuv keskkonnas kohaneda (Freund jt, 2013). Rikastatud keskkonnas elavate hiirte hipokampuses toimuv neurogeneesi ehk uute närvirakkude tootmise võimendumine on üks põhjalikumalt kirjeldatud fenomene geenide ja keskkonna interaktsioonidest (van Praag jt, 2000). Aju plastilisus on oluliseks füsioloogiliseks eelduseks taastumisprotsessidele. Näiteks uute neuronite juurdekasv on eriti intensiivne peale ajukahjustust, nagu ajuisheemia, epilepsiahood või ajukelmepõletik. Neurogeneesi molekulaarsete mehhanismide uurimine on meditsiiniliselt oluline ja loob võimalusi uute ravimite leidmiseks ning rakuteraapia rakendamiseks aju patoloogiate korral.

Füsioloogia instituudis on varem näidatud, et *Lsamp* mRNA tase on rikastatud keskkonnas kasvanud hiirte hipokampuses kõrgem kui standard- või individuaalmajutuses kasvanud hiirte ajus. Nii *Lsamp* 1a kui ka 1b transkriptide ekspressioon on hipokampuses suurem rikastatud majutuses kui standardtingimustes.

Käesolevas bakalaureuse töös on vaatluse all limbilise süsteemiga seotud membraanvalk (LSAMP). Kirjanduse ülevaade keskendub täiskasvanud hiire hipokampaalsele neurogeneesile ning *Lsamp* geenile ja valgule. Eksperimentaalne osa jaguneb kolmeks: 1. *Lsamp* erinevate promootorite (1a ja 1b) pealt algatatud ekspressiooni iseloomustamine erinevates organites ning ajuosades; 2. *Lsamp* promootorite anatoomilise jaotuse iseloomustamine hipokampuses; 3. *Lsamp* puudulike (*Lsamp*^{-/-}) ja metsiktüüpi (wt) hiirte kasvatamine standard- ja rikastatud majutuses, nende kehakaalu määramine ning bromodesoksüüridiin (BrdU) meetodikal baseeruv neurogeneesi määramise optimeerimine, et edaspidises töös analüüsida *Lsamp* geeni osalust täiskasvanud neurogeneesis.

Antud töö eksperimentaalne osa viidi läbi Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna Bio- ja siirdemeditsiini instituudis, Füsioloogia osakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Neurogenees arengus

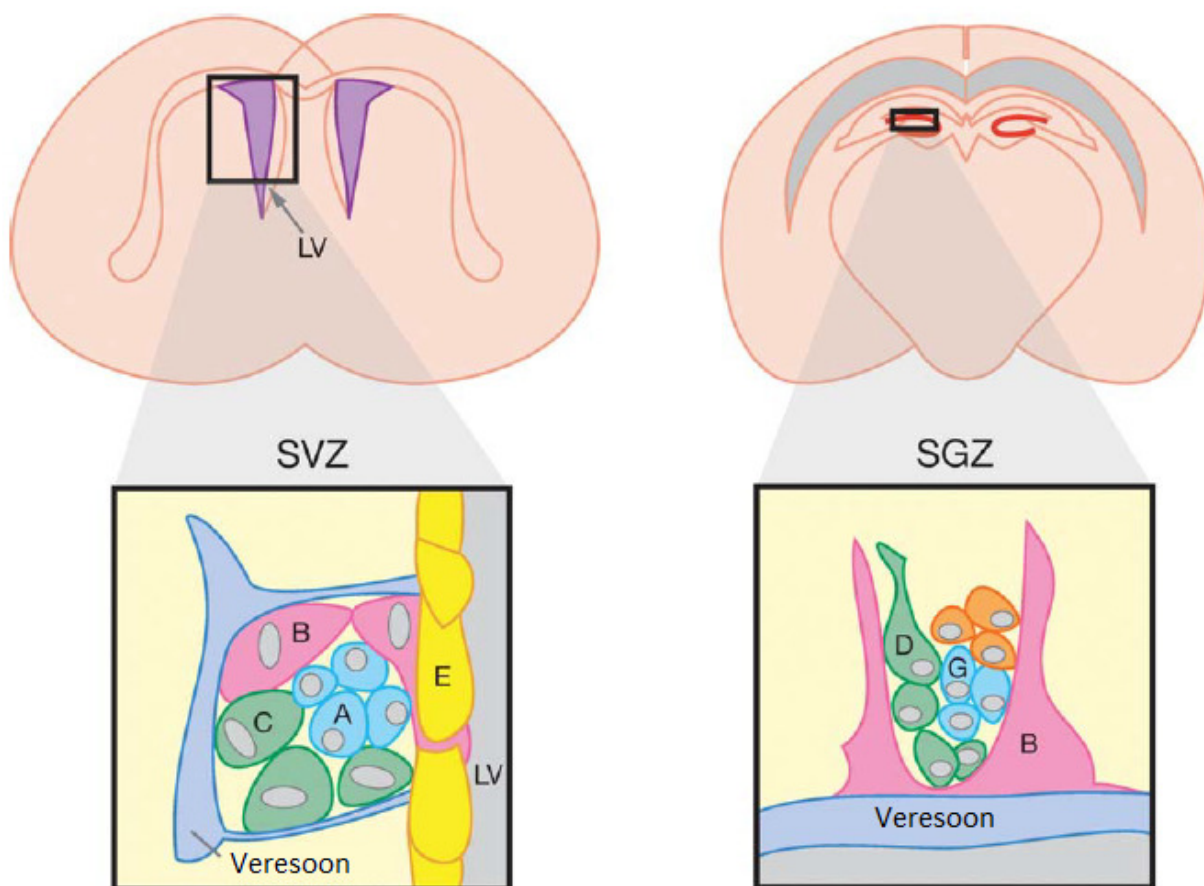
Embrüo arengu varajases faasis tekib kolm lootelehte: ektoderm, endoderm ja mesoderm. Neuronid pärinevad ektodermist. Blastotsöoli sisserullunud kordomesoderm indutseerib enda kohal ektodermis neuraalplaadi. Neuraalplaat süveneb esialgu neuraalvaoks ja sulgub seejärel neuraaltoruks. Kogu edasine kesknärvisüsteemi arenemine on seotud neuroepiteeli rakkude lokaalse vohamisega, migreerumise ja valikulise hukkumisega. Neuraaltoru eesosas (arenev peaaaju) tekib esialgu kolm ja seejärel viis ajupõiekest. Kolme ajupõiekesse staadiumis on eristatavad eesaju, keskaju ja rombaju. Viie ajupõiekesse staadiumis jaguneb eesaju otsajuks ja vaheajuks ning rombaju jaguneb tagaajuks ja piklikajuks. Neurotsöoli ümbruses olevad rakud moodustavad ventrikulaartsooni, millest peaaaju piirkonnas kujuneb hiljem endodüüm. Ventrikulaartsoonist (primaarne jagunemistsoon) välja migreeruvad rakud annavad aluse kõikidele ajustruktuuridele, ka ajutistele sekundaarsetele jagunemistsoonidele – subventrikulaarkihile arenevas eesajus ja välimisele granulaarrakkude kihile arenevas väikeajus (Kärner, J., 1997).

1.2 Neurogenees täiskasvanud närilistes

Neurogeensed nišid on defineeritud kui mikrokeskkonnad, mis anatoomiliselt majutavad tüvirakke ja kontrollivad nende arengut *in vivo*. Unikaalne niši struktuur piirab täiskasvanu ajus aktiivse neuronegeesi kahte piirkonda: subventrikulaar- ning subgranulaartsooni (Riquelme jt, 2008).

Täiskasvanu neurogenees on protsess, mille käigus toodetakse funktsionaalseid neuroneid neuraalsetest prekursor- ehk eellasrakkudest ning see kestab terve elu vältel kindlates aju regioonides. Normaalse tingimuste juures toimub pidev neurogenees kahes aju piirkonnas: subgranulaartsoonis (SGZ), mis on hipokampuse hammaskäärude osa ja subventrikulaartsoonis (SVZ), mis asub külgmiste vatsakeste külgselinas endodüümi kohal. SVZ toodetud uued neuronid migreeruvad haistesibulasse koondudes ühtseks rostraalse migratsiooni vooks (*rostral migratory stream* – RMS), kus rändavad rakud on üksteisega kontaktis (Marin ja Rubenstein, 2003). Erinevalt aga enamuse imetajatest, puudub inimestel rostraalne migratsiooni voog ning külgvatsakeste seinas moodustuvad neuroblastid ei rända mitte haistesibulasse, vaid striatumisse (Ernst jt, 2014). Teistes kesknärvisüsteemi piirkondades on

neurogenees piiratud normaalsete füsioloogiliste tingimuste juures, kuid võib suurenda ajukahjustuse korral (Gould, 2007).



Joonis 1. Illustratsioon neuraalsete tüvirakkude nišist. Vasakul pildil külgmised vatsakesed (*lilla*) ja subventrikulaartsoon ning paremal pildil hipokampus (*punane*) ja subgranulaartsoon. Neuraalsed tüvirakud on märgitud mõlemal pildil roosaga. Subventrikulaartsoonis funktsioneerivad progenitorrakkudena astrotsüüdid (*B*), mis voorderdavad endopäälakke (*E*). Astrotsüütidest tekivad TA rakud (transient amplifying cells) ehk üleminekurakud (*C*), mis omakorda toodavad neuroblaste (*A*). Subgranulaartsoonis on astrotsüüdid (*B*) kinnitunud veresoonele, kus nad saavad signaale endoteeli rakkudelt, mis suunavad tüvirakke ennast uuendama, proliferereuma (*D*) ja diferentseeruma (*G*). (Li ja Xie, 2005).

Täiskasvanu subventrikulaartsoonis tekivad radiaalgliia rakkudest neuroblastid, mis migreeruvad mööda astrotsüütide moodustunud toru haistesibulasse (Lois jt, 1996). Jõudes haistesibula südamikku irduvad mitteküpsed neuronid rostraalsest migratsiooni voost ning migreeruvad radiaalselt haistesibula püsmakeste poole, kus nad diferentseeruvad eritüüpi interneuroniteks (Lledo jt, 2006). Enamik neist muutub GABA-ergilisteks granulaarneuroniteks. Neil puuduvad aksonid ning nad moodustavad dendro-dendriit sünapseid mitraalrakkudega. Mitraalrakkude aksonid koonduvad kimpudesse ja juhivad haistmisrakkudelt tuleva närviimpulsi edasi peaaju erinevatesse sihtpunktidesse. Mitraalrakke on kahte tüüpi: ühed (*mitral cells*) paiknevad haistesibula koore sügavamas kihis ja osalevad

erinevate lõhnamolekulide olemasolu määramisel ning teised (*tufted cells*) on hajutatud koore pindmisesse kihti ja osalevad lõhnamolekulide kontsentratsiooni määramisel (Nagayama jt, 2004).

Täiskasvanu subgranulaartsoonis, mis on hipokampuse hammaskääru osa, prolifereeruvad radiaal- ja mitteradiaal prekursorrakud moodustavad intermediaarseid eellasrakke, mis omakorda toodavad neuroblaste (joonis 1). Mitteküpsed neuronid migreeruvad sisemisse granulaarrakkude kihti ja diferentseeruvad hipokampuses hammaskääru granulaarrakkudeks. Mõne päeva jooksul sirutavad uued neuronid oma dendriidid molekulaarse kihi suunas ja suunavad oma aksonid läbi hiiluse CA3 piirkonna suunas (Zhao jt, 2006). Võrreldes küpsete granulaarrakkudega on uued neuronid ülitundlikud ärritustele ja suurenenud sünaptilise plastilisusega teatud arenguetappide vältel (Ge jt, 2008). Peale küpsemise faasi omavad uued neuronid küpsetele neuronitele sarnaseid elektrofüsioloogilisi omadusi.

Täiskasvanu neurogeense niši rakulisteks komponentideks on endoteeli rakud, astrotsüüdid, endopodiaalrakud, mikroglia, küpsed neuronid ja täiskasvanu neuraalsed prekursorrakud. Vaskulaarrakud mängivad neuraalsete prekursorrakkude proliferatsiooni regulatsioonis olulist rolli. Roti subventrikulaartsooni transplantatsioon koos endoteelirakkudega suurendab neuraalset diferentseerumist (Leventhal jt, 1999). Subgranulaartsoonis on tihedad jagunevate rakkude klastrid anatoomiliselt lähedal vaskulatuurile, eriti kapillaaridele (Palmer jt, 2000). Vaskulatuur varustab uute neuronite migratsiooni substraatidega peale ajukahjustust täiskasvanu juttkehas (Kojima jt, 2010). Astrotsüüdid ekspresseerivad mitmeid sekreteeritavaid ja membraanseid faktoreid, mis reguleerivad neuraalsete prekursorrakkude proliferatsiooni ja saatust, kui ka migratsiooni, küpsemist ja sünapside moodustumist (Barkho jt, 2006). Subventrikulaartsoonis ekspresseerivad astrotsüüdid Robo retseptoreid ja reguleerivad neuroblastide kiiret migratsiooni rostraalses migratsiooni voos (Kaneko jt, 2010). Subventrikulaartsooni astrotsüüdid vabastavad ka glutamaati, mis reguleerib neuroblastide ellujäämist. Endopodiaalrakud vooderdavad ventrikulaarseina ning on lähedases ühenduses neuraalsete prekursorrakkudega, mis käituvad neurogeenset niši kaitsva kilbina. Endopodiaalrakud sekreteerivad signaalmolekuli Noggin, mis reguleerib neuronite saatust (Lim jt, 2000). Mikroglia reguleerib samuti aktiivselt täiskasvanu neurogeneesi. Tavatingimuste juures uute neuronite apoptootilised rakud fagotsüteeritakse nišist mitteaktiveeritud mikroglia poolt subgranulaartsoonis. Põletikuliste tingimuste juures taasaktiveeritud mikroglia võib olla nii kasuliku kui ka kahjuliku efektiga – see oleneb sekreteeritud molekulide põletikuliste ja mittepõletikuliste toimete tasakaalust (Ekdahl jt, 2009).

Küpsed neuronid täidavad samuti niši komponendi rolli. Nad reguleerivad täiskasvanu neurogeneesi läbi erinevate neurotransmittersüsteemide. Subgranulaartsoonis lokaalsed interneuronid vabastavad GABA neurotransmittereid, mis reguleerivad rakkude proliferatsiooni ja küpsemist, dendriitide arengut ja uute neuronite sünaptilist integratsiooni (Ge jt, 2006). Neurogeensel nišil on ka märkimisväärne rakuline plastilisus, mis aitab säilitada terviklikkust ebasoodsate tingimuste juures. Näiteks peale endokriinse ventrikulaarseina rasket kahjustust, järelejäänud eellasrakud aitavad parandada ja taastada subventrikulaarset niši (Kuo jt, 2006).

1.2.1 Inimese neurogenees

Inimeste puhul on märkimisväärne, et erinevalt teistest imetajatest inimesel haistesibulas neurogeneesi ei toimu (Bergmann jt, 2012). Neuronite juurdekasv on hiirel võrreldav keskealise inimesega, vananedes langeb hipokampaalse neurogeneesi tase hiirel järsemalt kui inimesel (Spalding jt, 2013). Inimeste hipokampaalne neurogenees on säilinud inimese evolutsiooni käigus tagamaks kongniitiivse adaptatsiooni ja haistesibula neurogenees on taandunud vähenenud haistmismeele kasutamise vajadusele võrreldes meie eelkäijatega. Lisaks hipokampusele toimub inimestel neurogenees ka külgmiste vatsakeste seinas, subventrikulaartsoonis, mis on teistel imetajatel haistesibulasse migreeruvate neuronite valmimiskohaks. Nendes kahes piirkonnas on neuroblastide tootmine väga sarnane, esimeste sünnijärgsete kuude jooksul toimub rakkude massiline vähenemine, millele järgneb pidev neuronite juurdetootmine ning vanuse kasvades aeglane kahanemine (Göriz ja Frisen, 2012, Knoth jt, 2010, Sanai jt, 2011).

Ernst jt, (2014) näitasid kasutades DCX (doublecortin) ja PSA-NCAM neuroblastide markereid, et täiskasvanud inimese ajus integreeruvad uued neuronid ka juttkehasse (striatum). Kasutades IdU (jododesoksüuridiin) markerit ja radiosüsiniku meetodil (^{14}C) juttkeha neuronite dateerimist (eluea määramist), näitasid juttkehas interneuronite tootmist. Samuti näitasid nad, et Huntingtoni tõve puhul väheneb oluliselt juttkehas neuronite tootmine. On tõenäoline, et neuroblastid ja uued neuronid täiskasvanud inimese juttkehas tulenevad subventrikulaartsoonist. Seega võib inimeste ja näriliste neurogeneesi kõige suurem erinevus seisneda subventrikulaartsoonis toodetud neuroblastide migratsiooni suunas. Teine suur erinevus näriliste ja inimeste neurogeneesis võib olla subventrikulaartsoonis toodetud neuronaalsete alamtüüpide vahel (Ernst jt, 2014).

1.2.2 Täiskasvanu neurogeneesi molekulaarse regulatsiooni mehhanismid

Täiskasvanu neurogeneesi erinevaid aspekte reguleerivad nii sisemised kui välimised mehhanismid. Neurogenees on dünaamiline protsess, mis on reguleeritud nii positiivsel kui ka negatiivsel viisil keskkonna, endokriinsete ja farmakoloogiliste stiimulite poolt. Näiteks rikastatud keskkond, füüsiline aktiivsus ja õppimine tõstavad neurogeneesi täiskasvanud organismis, vananemine ja stress aga vähendavad hipokampaalse neurogeneesi taset. Molekulaarsel regulatsioonil osalevad mitmed signaaliülekanderajad, transkriptsioonifaktorid ja epigeneetilised regulaatorid (Ma jt, 2010). Arvestades täiskasvanud ja embrüonaalse neurogeneesi sarnasust on paljud sisemised signaalid konserveerunud nii embrüonaalses kui ka täiskasvanud neurogeneesis, kuid välimiste mehhanismide päritolu ja olemus võivad erineda. Epigeneetilised mehhanismid reguleerivad rakkude diferentseerumist embrüonaalse arengu kestel ning on olulised liidesed geenide ja keskkonna vahel täiskasvanueas. Elukestva funktsionaalse neurogeneesi olulisteks epigeneetilisteks mehhanismideks on näiteks DNA metüleerimine ja histoonide modifitseerimine ja miRNA-de poolt reguleeritud geeni ekspressioon.

Neurogeneesi erinevaid aspekte reguleerivad kasvufaktorid, metalloproteasid, neurotransmitterid ja hormoonid. Neuroblastide migratsioon on reguleeritud mitmete repellentide ja atraktantide vahelise koostööga ja juhtmolekulidega, mis paiknevad kindlates kesknärvisüsteemi piirkondades. Mitmed morfogeenid reguleerivad neuraalsete eellasrakkude püsimist, aktivatsiooni ja saatust, nagu näiteks Notch, Shh, Wnt, BMP.

Mitmed ekstratsellulaarselt sekreteeritud valgud reguleerivad neuraalsete tüvirakkude ja eellasrakkude proliferatsiooni täiskasvanud närilise kesknärvisüsteemis. Näiteks fibroblasti kasvufaktor 2 (FGF2) on oluline neuraalsete tüvirakkude säilimiseks (Zheng jt, 2004). Notch1 on oluline subventrikulaartsooni tüvirakkude säilimise ja eneseuundamise regulatsioonis (Hitoshi jt, 2004). Tsiliaarne neurotroofne faktor (CNTF) aitab kaasa neuraalsete eellasrakkude eneseuundamisele tõstes Notch1 ekspressiooni (Chojnacki jt, 2003). Transformeeriv kasvufaktor alfa (TGF α) on samuti oluline neurogeneesi regulaatormolekul, mis seondub epidermaalsete kasvufaktorite (EGF) retseptoritega. Neid retseptoreid leidub eelkõige rakkudel, mis on üleminekufaasis neuraalsetest tüvirakkudest neuroblastideks (Doetsch jt, 2002). Neid kasvufaktoreid toodetakse läbi kogu kesknärvisüsteemi, kuid funktsioneerivad vaid kindlates piirkondades, kus toimub neurogenees. Selline lokaliseeritud aktiivsus tagatakse FGF2, CNTF ja TGF α valke produtseerivate astrotsüütide rohkusega subventrikulaar- ja subgranulaartsoonis ning transmembraansete valkude rakuvälise domeeni

eraldamisega. Kesknärvisüsteemis on ka teisi regioone, kus on rohkelt astrotsüüte, kuid milles neurogeenset proliferatsiooni ei toimu, mis viitab sellele, et astrotsüütide rohkus ei ole ainsaks määravaks faktoriks. Olulisteks teguriteks on ka disintegriinid ja metalloproteasid (ADAM-id), mis eemaldavad valkude ekstratsellulaarse domeeni ning aktiveerivad sellega valgud (Yang jt, 2005).

Samuti on olulisel kohal sellisel regulatsioonil ka neurotransmitterid. GABA ja glutamaat reguleerivad neuraalsete tüvirakkude proliferatsiooni otseselt, muudatustega DNA sünteesis ja intratsellulaarse kaltsiumi kontsentratsioonis (Lo Turco jt, 1995). Need efektid võivad olla kohtspetsiifilised, kuna GABA ja glutamaadi puhul käituvad neuraalsed tüvirakud erinevalt ventrikulaartsoonis ja subventrikulaartsoonis (Haydar jt, 2000). Selle erinevuse põhjuseks võivad olla neurotransmitterite ja kasvufaktorite vahelised interaktsioonid. Dopamiinil on otsene mõju proliferatsioonile, kuna tema retseptorit, D2, ekspresseeritakse nii neuraalsetes tüvirakkudes kui ka prekursorrakkudes (Kippin jt, 2005). 5-hüdroksütrüptamiin ehk serotoniin võib samuti stimuleerida neuraalsete prekursorrakkude proliferatsiooni, omades märkimisväärset antidepressantset efekti (Banasr jt, 2004).

Hormoonid mõjutavad kõiki rakke kehas, kaasa arvatud neuroneid ning on seega olulised ka neurogeneesis. Näiteks kilpnäärmehormoon trijodotüroniin (T3) tõstab neuraalsete tüvirakkude proliferatsiooni täiskasvanud hiire subventrikulaartsoonis (Lemkine jt, 2005). Peale kilpnäärmehormooni osalevad neurogeneesis hormoonidest ka östrogeen ja prolaktiin. Neurogeneesi intensiivsus sõltub östrogeenide kontsentratsioonist ja soost. Emastel rottidel on hipokampuse neurogenees intensiivsem inna ajal, mis on seotud kõrgema östrogeeni tasemega. Neurogeneesi intensiivsus on kõige kõrgem proöstruse ajal (kui östrogeeni tase on kõrgeim) ning pisut madalam östruse ja diöstruse ajal. Peale munasarjade kirurgilist eemaldamist langeb neurogeneesi tase, kuid on taastatav östrogeni asendusteraapiaga (Tanapat jt, 1999). Prolaktiin tõstab subventrikulaartsooni proliferatsiooni ja neuronite differentseerumist ning on oluline raseduse ajal, kuna haistesibul on kriitilise tähtsusega järglaste tundmisel, kasvatamisel ning maternaalse käitumise kujunemisel. Mutatsioon prolaktiini retseptori geenis põhjustab emastel hiirtel maternaalse käitumise defitsiiti (Shingo jt, 2003). Testosteroonist toodetud östrogeen reguleerib neurogeneesi, suurendades vaskulaarse endoteeli kasvufaktori (VEGF) vabastamist, mis omakorda stimuleerib ajus toodetava kasvufaktori (BDNF) vabastamist vaskulaarsetest endoteeli rakkudest (Palmer jt, 2000). BDNF soodustab neuroblastide differentseerumist ja ellujäävust (Zigova jt, 1998).

1.3 Adhesioonimolekulide osalus neurogeneesis

Neuronite pinnal paiknevad raku adhesioonimolekulid (CAMid) on olulised nii arenevas kui ka täiskasvanud ajus. CAMid reguleerivad neuronaalset migratsiooni, neuriitide väljakasvu ja aksonite suunamist arenevas ajus. Nad mängivad ka olulist rolli sünaptilise plastilisuse regulatsioonis täiskasvanud ajus ja aksonite regenereerimisel kahjustatud närvisüsteemis. Neuronaalsed adhesioonimolekulid on närvikoes olulised rakkudevaheliste sidemete moodustamises. Närvisüsteemis esineb kolm peamist raku adhesioonimolekulide alamgruppi: kadheriinid, integriinid ja IgCAMid.

IgCAMide hulka kuuluvad NCAM (neuraalne raku adhesiooni molekul) ja L1. NCAM ja tema polüsiaalhappega seotud vorm PSA-NCAM on kesknärvisüsteemis peamisteks aju plastilisuse kujundajateks. NCAMid loovad homofiilseid interaktsioone, st raku pinnal paiknevad NCAM molekulide ekstratsellulaarsed domeenid ühinevad külgnevatel rakkudel. Selline interaktsioon on oluline arenevas närvisüsteemis neuronaalsel migratsioonis ja diferentseerumisel ning täiskasvanud ajus mälu kujunemise ja aju plastilisuse regulatsioonis (Ditlevsen jt, 2008; Kraev jt, 2011). L1 molekulid loovad samuti homofiilseid interaktsioone, mis on olulised nii kesknärvisüsteemi arengul, kui ka täiskasvanu närvisüsteemis (Schachner, 1989). On näidatud, et L1 on oluline neuronaalsel migratsioonis ja ellujäämisel, neuriitide väljakasvul, aksonite suunamisel ja sünaptilisel plastilisusel (Hortsch jt, 2000).

Kadheriinid loovad sarnaselt IgCAMidele rakk-rakk interaktsioone. Kadheriinide abil toimub tüvirakkude sidumine tugirakkudele, mis aitab tüvirakkudel püsida ankurdatuna neurogeenses nišis (Takeichi, 1995).

Erinevalt teistest adhesioonimolekulidest interakteeruvad integriinid ekstratsellulaarse maatriksiga (ECM). Ekstratsellulaarne maatriks on makromolekulidest koosnev võrgustik, kuhu raku kinnituses moodustub rakk-maatriks kontakt. Integriinid klasterduvad spetsiifiliselt ECMga ja moodustavad dünaamilise sideme rakuvälise ja rakusise keskkonna vahel. Sellised interaktsioonid soodustavad korrektset kesknärvisüsteemi arengut reguleerides neuraalsete tüvirakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist (Wojcik-Stanaszek jt, 2011). ECM võimaldab signaali ülekannet rakku ning rakk saab reageerida ärritajatele. Korrektne vastus ekstratsellulaarsele signaalile on võimalik tänu raku pinnal olevatele integriini retseptoritele ning seega on võimalik käivitada rakusisene kaskaad, mis vastutab neuraalsete tüvirakkude säilitamise, migratsiooni ja ellujäämise eest (Flanagan jt, 2006).

1.3.1 *Lsamp* geen ja limbilise süsteemiga seotud membraanvalk

Limbilise süsteemiga seotud membraan valk ehk LSAMP (limbic system-associated membrane protein) on *Lsamp* geeni produkt, mis kuulub immunoglobuliinide superperekonda (IgSF) ning koosneb kolmest immunoglobuliini domeenist. LSAMP on adhesioonimolekul ning ta on seotud neuronite aksonite suunamise ja neuriitide väljakasvuga (Pimenta jt, 1995). Varajases embrüogeneesis kinnitub LSAMP valk glükosüülfosfatidüül inositol (GPI) ankru vahendusel aksonite pinnale ja kasvu koonustele, kus ta käitub kui selektiivne homofiilne adhesioonimolekul. Täiskasvanud organismis ekspressioon aksonitel puudub ning esineb postsünaptiliselt rakukehal ja dendriitidel. *Lsamp* geen on inimeste ja näriliste vahel evolutsiooniliselt konserveerunud, LSAMP valk erineb ainult nelja aminohappe poolest. *Lsamp* geen koosneb 11-st eksonist, mis on jagatud üle 2,2 Mb suuruse ala. Geeni ebahariliku suuruse põhjuseks on kaks esimest eksonit, 1a ja 1b, mille vahel on 1,6 Mb suurune intron (Pimenta ja Levitt, 2004).

Lsamp geeni kahel promootoril on erinevates kudedes erinev aktiivsus: 1a promootori ekspressioon domineerib limbilise süsteemi osades nagu näiteks hipokampus ning 1b promootor ekspresseerub kõige tugevamalt ajuosades, mis töötlevad sensoorset informatsiooni nagu näiteks taalamuse sensoorsed tuumad ning primaarsed ning sekundaarsed sensoorse töötlusega seotud korteksi piirkonnad (Philips jt, 2014). *Lsamp* geeni alternatiivsetelt promootoritelt, 1a ja 1b, on signaal tuvastatav embrüonaalse arengu 12,5 päeval (E12,5). LSAMP 1a transkript aktiveeritakse esmalt keskajus, eriti silmapaistvalt neuraaltoru välimistes kihtides. Eesajus on 1a transkript detekteeritav embrüonaalse arengu 13,5 päeval (E13,5) neuroepiteeli väliskihil. 1b transkripti esmane ekspressioon on tuvastatav külgmiste vatsakeste lateraalsel küljel. Hilisemal embrüonaalsel arengul (E15,5) on tugev signaal tuvastatav ka ajusillas ja neokorteksi sensoorses alas. Embrüonaalse arengu 15,5 päeval on *Lsamp* 1a promootor eriti aktiivne juttkehas, kuid see aktiivsus hajub esimese sünnijärgse nädala jooksul ning täiskasvanud aju detekteeritav pole. *Lsamp* 1b promootori ekspressioon arengu käigus juttkehas on nõrk ning täiskasvanu ajus mõõdukas (Philips jt, 2014).

Lsamp-puudulikud hiired on hüperaktiivsed, vähenenud ärevusega, nad on aeglasemad ujujad, ei ilmuta agressiivsuse märke, neil puudub hierarhia ning seega nad ei püga ka üksteisel vurrusid (Innos jt, 2012). LSAMP valk tõstab hipokampaalsete neuronite sünaptoogeneesi ning on näidatud, et *Lsamp*-puudulikkusega hiire hipokampuses esinevad muutused sünaptilises ülekandes (Hashimoto jt, 2009; Qiu jt, 2010). Inimuurigute läbiviimisel on leitud seoseid

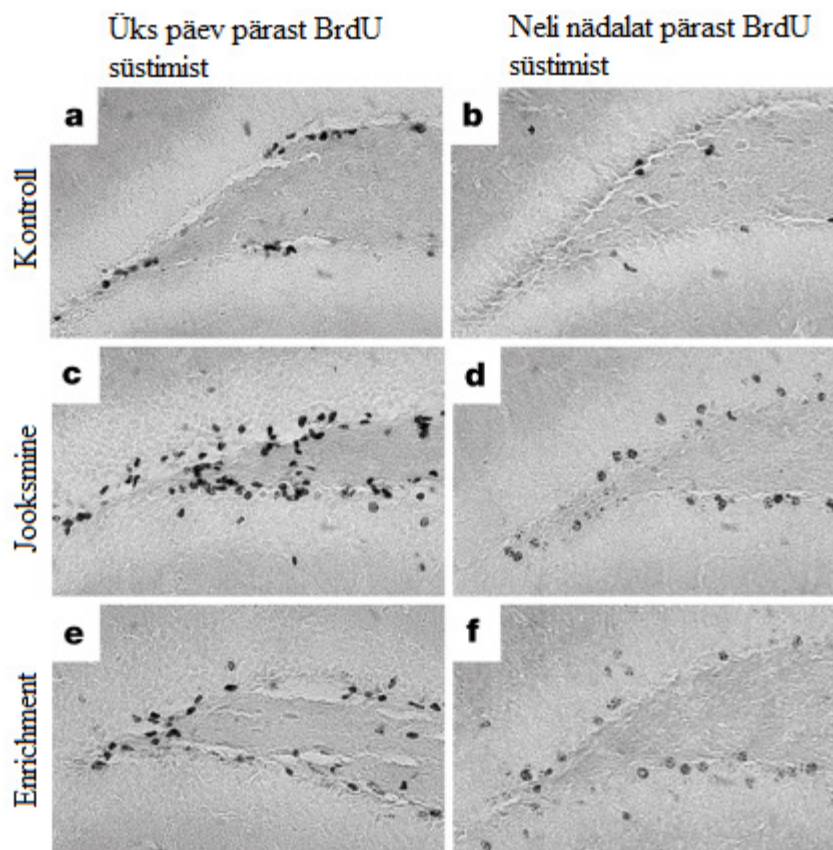
Lsamp geeni polümorfismide ja mitmete psühhiaatriliste häirete vahel: on leitud, et teatud polümorfismid *Lsamp* geenis on riskigenotüübiks depressiooni (MDD) (Koido jt, 2012) ja skisofreenia (Koido jt, 2014) kujunemisel. Ka on leitud, et skisofreenia ja bipolaarse häirega patsientidel on frontaalkoores LSAMP valgu tase märkimisväärselt kõrgem (Behan jt, 2009).

Lsamp on osutunud ka tuumorsupressorgeeniks: hiljutised uuringud on näidanud, et LSAMP valk on neerukartsinoomi (Chen jt, 2003), müeloidse leukeemia (Kühn jt, 2012) ja osteosarkoomi (Kresse jt, 2009) tuumor supressoriks.

1.4 Näriliste neuraalne areng rikastatud keskkonnas

Rikastatud keskkonnas (enrichment) hoitakse katseloomi suuremates puurides, nad on suuremates gruppides, puuris esinevad tunnelid, pesamaterjal, jooksuratas ning muud atraktsioonid. Taolised lisaelemendid, üldine füüsiline aktiivsus ja sotsiaalsed interaktsioonid tõstavad katselooma hipokampaalset neurogeneesi (Van Praag jt, 2000).

Rikastatud keskkond ja vabatahtlik füüsiline aktiivsus jooksurattal tõstavad katseloomadel uute neuronite juurdekasvu ja elulemust hipokampuse hammaskäärus, kuid mitte haistesibulas (Brown jt, 2003). Samuti on neil võrreldes tavatingimustes elavate katseloomadega rohkem gliarakke, dendriidid on rohkem hargnenud, nende aju on kaalult raskem, mõõtudelt suurem ning neuronitel on suurenenud võime moodustada sünapse. Võrreldes standardtingimustes elavate närilistega on enrichment katseloomadel parem mälu ning nad tulevad paremini toime erinevate õppimisülesannetega, nagu näiteks ruumilise mälu testimiseks mõeldud vesilabürint test ja T-maze test (Van Praag jt, 2000).



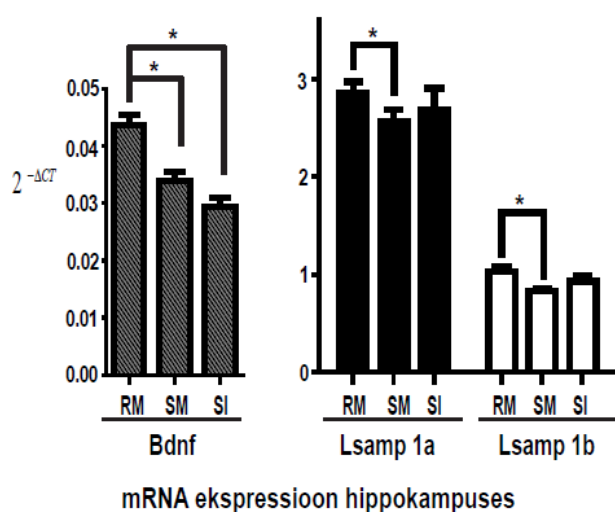
Joonis 2. Rikastatud keskkonna ja jooksuratta mõju rakkude proliferatsioonile (üks päev pärast BrdU süstimist) ja neurogenesile (neli nädalat pärast BrdU süstimist) hipokampuse hammaskäarus. Nii rikastatud keskkond (e,f) kui ka vabatahtlik füüsiline aktiivsus jooksurattal (c,f) tõstavad uute neuronite elulemust võrreldes kontrollgrupi hiirtega (a,b) (Van Praag jt, 2000; pilt on adapteeritud).

Rikastatud keskkonnas elavatel hiirtel on suurenenud närvikasvufaktori (NGF), BDNF ja gliiarakus toodetava närvikasvufaktori (GDNF) geeni ekspressioon. Füüsiline aktiivsus tõstab IGF-1, FGF-2 ja BDNF ekspressiooni. Paljud neist kasvufaktoritest, eriti NGF ja BDNF on olulise funktsiooniga õppimisel ja sünaptilise plastilisuse väljakujunemisel. Füüsiline aktiivsus muudab ka mitmete neurotransmittersüsteemide aktiivsust ajus: mõjutab kolinergilisi parameetreid, koliini omastamist hipokampuses ja korteksis; aktiveerib monoamiine, nagu noradrenaliin ja serotoniin ning suureneb ka opioidide aktiivsus. Kõik need transmitterid osalevad õppimisel ja sünaptilise plastilisuse tekkimisel täiskasvanud ajus ning monoamiinid funktsioneerivad ka neurogeneses, nt serotoniini kahanemine langetab ka tüvirakkude proliferatsiooni hammaskäarus (Van Praag jt, 2000).

Rikastatud keskkond omab terapeutilist mõju ka patoloogiate korral nagu insult, epilepsia, stress ning ka vananemine. On näidatud, et vabatahtlik füüsiline aktiivsus jooksurattal kaitseb katseloomi isheemia eest (Stummer jt, 1995). Ajukahjustuse või trauma korral parandab

rikastatud keskkond mälu ja motoorseid oskusi, suureneb aju kaal ja dendriitide hargnemine. Insuldi puhul suureneb NGF A ja glükokortikoidi retseptori mRNA tase, BDNF mRNA tase väheneb ning paranevad motoorsed oskused. Epilepsia korral tõstab rikastatud keskkond kasvufaktori geeni ekspressiooni ning hoitakse ära krambihooge. Vananemisel suurendab neurogeneesi ja gliogeneesi, NGF tase suureneb ning paraneb mälu (Van Praag jt, 2000).

Füsioloogia instituudis on varem näidatud, et *Lsamp* mRNA tase on rikastatud keskkonnas kasvanud hiirte hipokampuses kõrgem kui standard- või individuaalmajutuses kasvanud hiirte ajus. Nii *Lsamp* 1a kui ka 1b transkriptide ekspressioon on hipokampuses suurem rikastatud majutuses kui standardtingimustes (joonis 3).



Joonis 3. Vasakul diagrammil *Bdnf* ning paremal *Lsamp* 1a ja 1b ekspressioon hipokampuses erinevate kasvukeskkondade puhul. RM = rikastatud majutus, SM = standardmajutus, SI = individuaalmajutus. Andmed on esitatud keskmiste ekspressiooni väärtustena koos keskmise standardveaga (SEM). Tärn näitab andmete statistiliselt olulist erinevust $P < 0,05$ (Heinla jt, avaldamata andmed).

Lisaks on näidatud, et *Lsamp*-puudulikkusega hiirel on muutused hipokampuse sünaptilises ülekandes (Qiu, 2010). Seetõttu otsustasime käesolevas töös esmalt kirjeldada *Lsamp* ekspressioonimustrit hiire organismis ja spetsiifilisemalt anotoomilist ekspressioonimustrit hipokampuses ning seejärel alustada optimeerimistööd, mis võimaldaks hinnata, kas *Lsamp* väljalülitamine hiirel tekitab muutusi neurogeneesis.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

1. Iseloomustada *Lsamp* alternatiivsete promootorite aktiivsust erinevates organites ning ajuosades kvantitatiivse reaalaaja-PCRiga.
2. Iseloomustada *Lsamp* 1a ja 1b promootorite aktiivsuse anatoomilist mustrit hipokampuses.
3. Teha eelkatseid, et uurida *Lsamp* puudulikkuse võimalikku mõju neurogeneesile rikastatud keskkonnas.
 - 3.1 Kasvatada *Lsamp*-puudulikke ja metsiktüüpi pesakonnakaaslasid rikastatud majutuses iganädalaselt nende kaalu jälgides ning vahetades objekte puuris.
 - 3.2 Neurogeneesi uurimine BrdU meetodil; meetodi optimeerimine.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Katseloomad *Lsamp* promootorite ekspressiooni iseloomustamiseks

Katseloomadena kasutati isaseid BL/6 metsiktüüpi hiiri. Katseloomad paljundati Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonnas. Hiirte geneetiline taust oli C57BL/6 (BL/6).

Loomad olid katsete teostamise ajal vanuses 16 nädalat. Katseloomad elasid 12 h/12 h valge/pime tsüklis 22°C juures, valge tsükli algusega kell 7 hommikul. Hiirtele oli võimaldatud vaba juurdepääs granuleeritud spetsiaaltoidule ja joogiveele tilgapudelist. Katse teostati Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi poolt välja antud loa alusel (number 39, välja antud 2005). Kõik loomadega seotud protseduurid olid heaks kiidetud Tartu Ülikooli Loomkatsete Eetika Komitee poolt.

Katseloomad surmati tservikaalse disslokatsiooni läbi. Järgnevalt eemaldati pea keha küljest ning aju koljust. Eemaldatud aju prepareeriti jääl treenitud eksperdi poolt. Organite eraldamine toimus pea eemaldamise järgselt. Võimalusel eemaldati terviklik organ. Eraldatud ajustruktuurid ja organid külmutati koheselt vedelas lämmastikus ning säilitati temperatuuril -80°C. Hiire aju prepareerimiseks vajalikud juhised saadi hiire aju atlasest (Franklin ja Paxinos, 1997).

2.2.2 RNA eraldamine ja cDNA süntees

Rakuline RNA eraldati organite ja ajuosade homogeniseerimisel. Homogeniseerimisel kasutati Trizol® reagenti (Invitrogen) ning tootja juhiseid. Proovid homogeniseeriti esialgu 100 µl Trizoli® reagentis. Järgnevalt proovid uhmerdati ja lisati ülejäänud osa reagenti, kuni soovitud 500 µl mahuni. Järgnevalt inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit ja lisati kloroformi 200 µl (Sigma-Aldrich) ning raputati tuube 15 sekundit. Inkubeeriti veel 2 minutit ja tsentrifuugiti eeljahutatud tsentrifuugis (Eppendorf 5810 R) 12 000 rpm 15 min 4°C juures. RNA-d sisaldav vesifaas tõsteti ümber uude katsutisse ja lisati 250 µl isopropanooli (Naxo BioTop) RNA sadestamiseks. Proovid segati, inkubeeriti 10 minutit toatemperatuuril ja tsentrifuugiti 12 000 rpm 10 min 4°C juures. Järgnevalt isopropanool eemaldati ning lisati 1 ml jääkülma 75% etanooli. Proovid tsentrifuugiti viimast korda 7500 rpm 10 min 4°C juures. Etanool eemaldati ning RNA sade suspendeeriti üles 50 µl vees. Proovid segati vorteksil ning järgnevalt mõõdeti RNA kontsentratsioonid NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetria (NanoDrop Technologies).

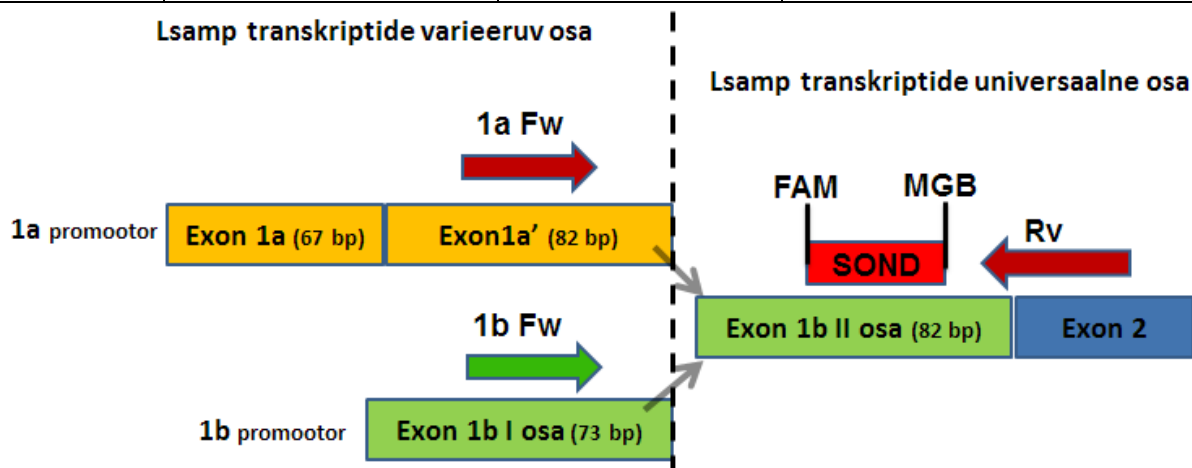
cDNA sünteesil kasutati SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (Invitrogen) ja heksameerseid oligonukleotiide vastavalt tootja juhendile. 20 µl reaktsiooni kohta võeti 1 µl (50 µg/ml) heksameerset praimerit (Applied Biosystems) ja 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas). Praimerite seondumisel inkubeeriti proove 5 min 65°C juures. Järgnevalt tõsteti tuubid reaktsiooni peatamiseks vähemalt 1 min jääle. cDNA sünteesiks lisati proovidele 4 µl 5X First-Strand Buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8,3 toatemperatuuril), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂], 1 µl 0.1 M DTT, 1,25 µl H₂O ja 0,75 µl SuperScript™ III pöördtranskriptaasi (200 U/µl). Proove inkubeeriti 60 min 50°C juures. Seejärel peatati reaktsioon hoides katsuteid 15 min 70°C juures. Sünteesitud cDNA proovid säilitati -80°C juures.

2.2.3 Kvantitatiivne reaalaaja-PCR

Praimerite selektsioon leidis aset Primer3 tarkvara vahendusel. Parimad praimerid testiti kontrollides amplikonide spetsiifilisust geelelektroforeesil, et kinnitada nende efektiivsus ja spetsiifilisus. Järgnevalt testiti valitud primereid ka kvantitatiivse reaalaaja-PCR (qRT-PCR) reaktsioonis. *Hprt* koduhoidja praimerid valiti eelnevalt läbiviidud katsete põhjal (tabel 1). Praimerite paigutus *Lsmp* geenil on esitatud alljärgnevalt (joonis 4). *Lsmp* eksonite 1a ja 1b korral kasutati universaalset sondi ja universaalset reverse praimerit.

Tabel 1. Reaalaja-PCRi reaktsioonis kasutatud hiire praimerite ja sondide järjestused.

Oligo	Forward	Reverse	Sond
<i>Lsamp</i> 1a	5'-GCA TTT TGG AAC CAG CCT CCT G-3'	5'-TTC TTG TCT TCT ACC ACA CAC CTG-3'	5'-FAM-AAC CGA GGC ACG GAC AAC-NFQ-MGB- 3'
<i>Lsamp</i> 1b	5'-CGA TCG GAA ACA GTT GCC GC-3'	5'-TTC TTG TCT TCT ACC ACA CAC CTG-3'	5'-FAM-AAC CGA GGC ACG GAC AAC-NFQ-MGB- 3'
<i>Hprt</i>	5'-GCA GTA CAG CCC CAA AAT GG-3'	5'-AAC AAA GTC TGG CCT GTA TCC AA-3'	5'-VIC-AAG CTT GCT GGT GAA AAG GAC CTC TCG- TAMRA-3'



Joonis 4. *Lsamp* geeni transkriptide varieeruv ja universaalne osa. *Lsamp* 1a ja 1b forward praimerite ja universaalse reverse praimeriga paigutus.

Lsamp transkriptide tase kvantiteeriti reaalaja-PCRi reaktsioonis. Kõik reaktsioonid viidi läbi eraldi korduste (singleplex) kujul kasutades TaqMan® geeniekspressiooni segu 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl] ja TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) reagenti. Kvantitatiivne reaalaja-PCR viidi läbi ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) ja ABI Prism 7900 SDS 2.4.2 tarkvara vahendusel. Reaktsiooni maht oli 10 µl ja igast proovist (1a, 1b ja *hprt*) villiti neli kordust. *Lsamp* transkriptide ekspressiooni tase mõõdeti FAM-märgistatud MGB-sondi kasutades ja standardiseeriti koduhoidja geeni *hprt* VIC-TAMRA sondi suhtes. *Hprt* efektiivsus ja stabiilsus referentsgeeninä on eelnevalt tõestatud (Raud jt, 2009). Andmed analüüsiti ja teisendati $2^{-\Delta CT}$ kujule (Livak ja Schmittgen, 2001). Kuna hiirte puhul on *Lsamp* geeni

ekspressioon juba anatoomiliselt kirjeldatud, siis oli antud tööloigu eesmärgiks anda ülevaade kvantitatiivse PCR meetodiga mõõdetavatest ekspressioonitasemetest hiire ajus ning võrrelda saadud ekspressiooniprofiili juba avaldatud histoloogiliste piltidega ning tekitada võrdlusemoment organites mõõdetava geeniekspressiooni tasemega, milleks madala koopiaarvu tõttu sobib vaid kvantitatiivne Q-PCR. Seetõttu ei teostatud antud katseosa puhul ka statistilist analüüsi vaid esitatakse andmed kirjeldavalt.

2.2.4 Detailsete piltide tegemine *Lsamp* 1a ning 1b promootorite ekspressioonist hipokampuses

Värvingud *Lsamp* 1a kui 1b promootorite ekspressioonist hipokampuses olid tehtud juba varem ning on üldisloomustavalt avaldatud Philips jt, 2014. Antud töö jaoks tehti uued suurema resolutsiooniga pildid *Lsamp* alternatiivsete promootorite ekspressiooni iseloomustamiseks hipokampuse erinevates osades. Pildid tegime 20 kordse objektiiviga kasutades Olympus DP71 kaameraga varustatud Olympus BX51 mikroskoopi.

Lsamp 1a promootori ekspressiooni kirjeldamiseks kasutati *in situ* hübridisatsiooni. *In situ* hübridisatsioon baseerub uuritava mRNA-ga komplementaarsel riboproovil. *In situ* sondi tegemiseks inserteeritakse vektorisse *Lsamp* geeni 1a promootorile spetsiifiline cDNA fragment, mis sisaldas hiire *Lsamp* geeni 1a ning 1a' eksonite järjestusi ning lisaks 1a spetsiifilise mRNA 5'-UTR järjestust (kokku 450 bp). Hiire ajulõikude RNAd hübridiseeritakse digoksygeniiniga märgistatud *Lsamp* sense ja antisense RNA sondidega ning seejärel inkubeeritakse digoksygeniini vastase antikehaga. *In situ* hübridisatsioon visualiseerib mRNA rakukehades.

1b promootori ekspressiooni kirjeldamiseks kasutati X-Gal-värvingut. *Lsamp*-puudulikkusega hiirte tegemisel on 1b promootor asendatud LacZ transgeeniga. Täpsemalt *Lsamp* geeni ekson 1b asendatakse NLS-LacZ-Neo konstruktiga, mille tulemusel inserteerub β -galactosidaasi kodeeriv LacZ reportergeen kohe pärast 1b promootorit. Ajudest tehti külmlõikuriga koronaalsed lõigud ja pandi alusklaasile. β -galactosidaasi aktiivsust detekteeriti X-gal substraadiga, mis β -galaktosidaasiga lõikamisel toodab sinist pigменти ning teeb promootori 1b ekspressiooni visuaalselt jälgitavaks. NLS-LacZ värving visualiseerib rakkude tuumasid.

Värvingute hindamiseks spetsiifilistes hipokampuse piirkondades kasutasime hiire aju atlast (Franklin ja Paxinos, 1997).

2.2.5 Katseloomad BrdU katse jaoks

Katseloomadeks olid hiired, kes olid paljundatud Tartu Ülikooli Arstiteaduskonna bio- ja siirdemeditiini instituudi füsioloogia osakonnas. Kasutasime *Lsamp* geeni puudulikkusega hiiri, s.o hiiri, kelle organismis funktsionaalne geen ja vastav valk puuduvad ning nende metsiktüüpi pesakonnakaaslasi, kellel oli funktsioneeriv *Lsamp* geen.

Kaheksa *Lsamp*(-/-) ja kaheksa *Lsamp*(+/+) hiirt paigutasime elama rikastatud majutusse (ehk *enrichment* majutus) s.t hiiri hoiti suuremates puurides (59,5 cm x 38,0 cm x 20,0 cm), milles oli lisaks allapanule ja pesamaterjalile ka tunnel, jooksurattad ja majake (joonis 5).

Kontrollgrupi hiired paigutasime standardmajutusse, s.o keskmise suurusega puur (42,5 cm x 26,6 cm x 15,5 cm), mis sisaldas allapanu ning pesamaterjali (jooksurattad, majake ning tunnel puudusid). Hiiri kaalusime kord nädalas alates hiirte kolmandast elunädalast kuni kaheateiskümnenenda elunädalani.



Joonis 5. Illustreeriv pilt rikastatud keskkonna puurist jooksurataste, tunneli, pesaehituseks mõeldud vati ja majakesega.

2.2.6 BrdU lahuste valmistamine ja süstimine

Hiirtele süstiti kolm korda päevas kahetunniste vahedega 20 mg/ml BrdU-d sisaldavat 0,9% NaCl lahust. Lahus valmistati vahetult enne süstimist, parema lahustuvuse saavutamiseks lisati 2 ml lahuse kohta 10 µl 10 µM NaOH lahust. Enne süstimist soojendati lahus 37°C-ni. Süstimine käis kehakaalu järgi – 50 µl 10 grammi kehakaalu kohta. Paralleelselt esimese süstimiskorraga tehti hiirtele ka sabamärgised. Esimesel päeval süstiti BrdU-ga neli *Lsmp*^{+/+} hiirt ja neli *Lsmp*^{-/-} hiirt. Teisel päeval süstiti ülejäänud hiired BrdU-ga ja eelmisel päeval süstitud hiired perfuseeriti.

2.2.7 Perfuseerimine ja ajude eraldamine

Üks ööpäev peale BrdU süstimist järgnes hiirte perfuseerimine ja ajude eraldamine. Perfuseerimise eelselt viidi katsehiired sügavasse narkoosi, kasutades anesteetikumina 4% kloraalhüdraati. Anesteseeritud hiir asetati selili vahtpolüstüreeni raamistikule ning tema esi- ja tagajäsemed kinnitati raamistiku külge. Katselooma rindkere lõigati lahti, südame vasakusse vatsakesse sisestati süstla ots ja paremasse vatsakesse lõigati avaus. Kõigepealt lasti läbi kanüüli füsioloogilist lahust, et puhastada veresoonkond ja aju verest. Peale vere väljumist lasti läbi kanüüli 4% paraformaldehüüdi lahus (4% PFA 0,1 M PB-s).

Perfuseeritud hiire pea lõigati keha küljest, aju eemaldati koljust ja eraldati aju poolkerad ja väikeaju (väikeaju meie katses vaja ei läinud). Ajupoolkerad pandi ööpäevaks 4°C juurde 4% PFA fiksaatorisse seisma ning 24 tunni möödudes pandi veel ööpäevaks 20% sahharoosi ja 4% PFA lahusesse ja hoiti 4°C juures. Sahharoosi lahuses toimub postfiksatsiooniline veetustamine, mis tagab ajude külmutamisel rakkude terveks jäämise. Järgnevalt ajud külmutati –80°C juures, kus neid säilitati kuni külmlõikude tegemiseni.

2.2.8 Immunohistokeemia ja mikroskoopia

Kuna käesoleva bakalaureusetöö käigus toimus BrdU immunohistokeemilise tuvastamise protokoll optimeerimine, kasutati mitmeid erinevaid protokoll variatsioone. Järgnevalt on toodud põhiprotokoll.

Külmutatud ajudest tehti 40 µm paksused lõigud ning pandi fosfaatpuhvri (PBS) lahusesse. Lõike permeabiliseeriti PBS/0,25% Triton X-100 lahuses 2X 10 min. Endogeense peroksüdaasi inhibeerimiseks tehti 0,6% vesinikperoksiidi töötlus 30 min. Seejärel pesti lõike 3X 10 min PBS/0,25% Triton X-100 lahuses. Membraanide lõhkumiseks töödeldi lõike 15

min jooksul 0,5 mg/ml trüpsiini ja 0,2% CaCl_2 sisaldavas 0,05M Tris/HCl puhvris (pH 7,6). Järgnes 3X 10 min pesu PBS/0,25% Triton X-100 lahuses, mille järel tehti DNA ahelate harutamiseks 2M HCl töötlus 37°C juures 30 min. Seejärel pesti lõike PBS/0,25% Triton X-100 lahuses 4X 10 min. Ebaspetsiifilise antikeha seondumiskohtade blokeerimiseks kasutati 10% hobuse või küüliku normaalseerumit PBS/0,25% Triton X-100 lahuses (hobuse seerumit juhul, kui sekundaarne antikeha oli valmistatud hobuses või eeslis ning küüliku seerumit juhul, kui sekundaarne antikeha oli valmistatud küülikus). Blokeerimine toimus toatemperatuuril 1h kestel. Seejärel inkubeeriti lõike üleöö 4°C juures hiire või rotis tehtud BrdU vastase antikehaga 2% seerumi juuresolekul. Hiire tehtud antikeha (Abcam) lahjendati 1:100, rotis tehtud antikeha (AbD Serotec) 1:200 PBS/0,25% Triton X-100/ 0,25% Tween(20) lahuses. Järgmisel päeval pesti lõigud 3X 10 min jooksul PBS/0,25% Triton X-100 lahuses seondumata primaarsest antikehast puhtaks ning inkubeeriti 1h kestel biotinüleeritud sekundaarse antikehaga. Kasutati hiire IgG vastast hobuse antikeha (Vector Laboratories; lahjenduses 1:200), roti IgG vastast eesli antikeha (Jackson ImmunoResearch; lahjenduses 1:300) ning roti IgG vastast küüliku antikeha (lahjenduses 1:200). Antikehad lahjendati PBS-s, millele lisati kas hobuse (eeslis ja hobuses tehtud antikeha puhul), või küüliku (küülikus tehtud antikeha puhul) seerumit vastavalt Vectastain Elite ABC Kit'i (Vector Laboratories) protokollile. Sekundaarse antikehaga inkubeerimise järgselt pesti lõike 3X 10 min jooksul PBS-s. Värvusreaktsiooni esiletoomiseks kasutati diaminobensidiini (DAB; Vector Laboratories) ning lasti värvuda kuni soovitud tulemuseni. DAB reaktsioon peatati kraaniveega. Hiljem tõsteti lõigud 0,5% želatiiniga kaetud alusklaasidele, lasti kuivada ning sulundati Pertex'iga.

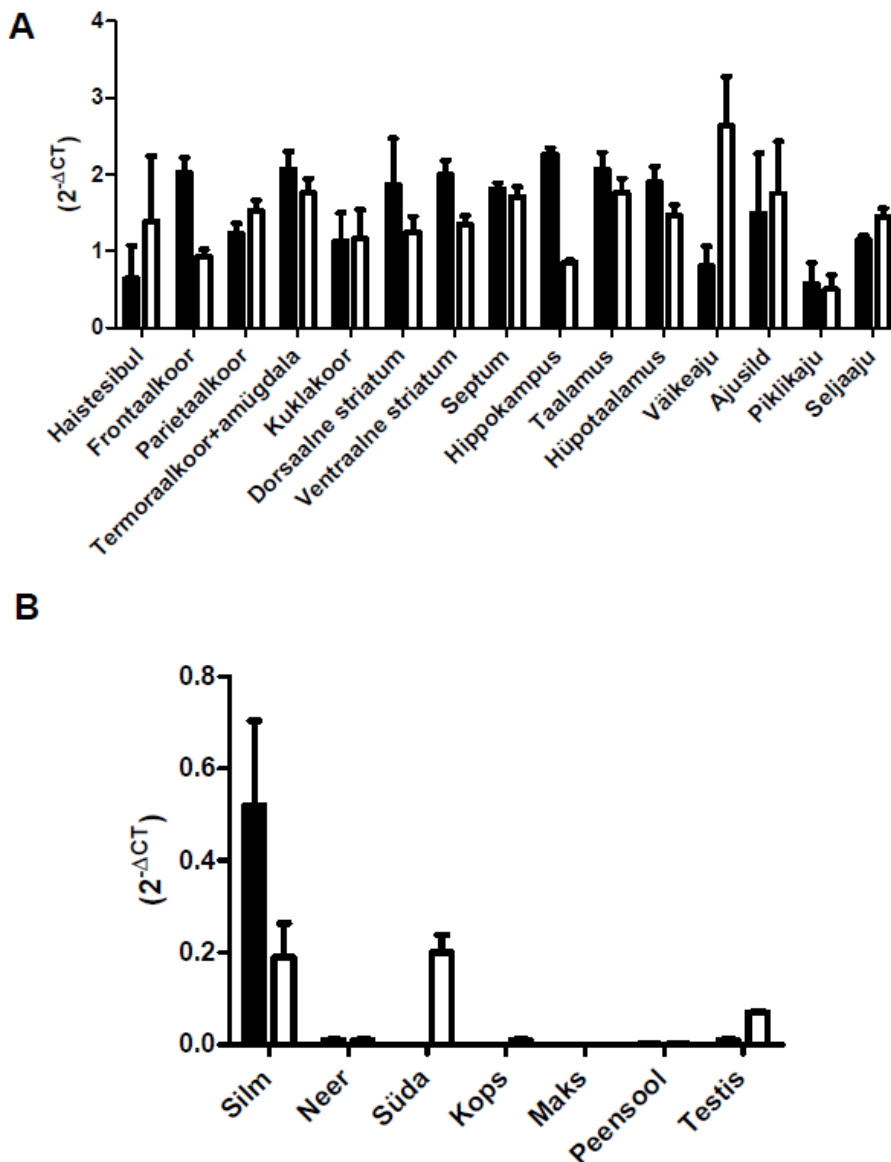
Protokolli optimeerimise käigus asendati, lisati või eemaldati osad punktid. Kastetati PBS/Triton X-100 pesude asendamist ilma Triton'ita PBS-i pesudega. Osadele lõikudele tehti lõikamise järgselt töötlust kuuma tsitraadiga. Muudeti vesinikperoksiidi kontsentratsiooni ja katsetati HCl-ga inkubeerimist enne vesinikperoksiidi töötlust. Katsetati trüpsiinitötluse ärajätmise mõju eksperimendi tulemustele. Katsetati ka lühemaid pesude ja inkubatsioonide aegu ning erinevaid antikehade kontsentratsioone. Positiivse kontrollina kasutasime Küllä Jaakolt saadud Farmakoloogia instituudis BrdU-ga süstitud hiire aju lõike, millel teadaolevalt sarnane protokoll pidi töötama. Värvunud lõike pildistati Olympus DP71 kaameraga varustatud Olympys BX51 mikroskoobiga.

2.3 Tulemused

2.3.1 Reaalaja-PCR tulemused

Reaalaja-PCRi abil tuvastati alternatiivsete *Lsamp* geeni promootorite 1a ja 1b transkriptide ekspressioon neuraalsetes ja mitteneuraalsetes kudedes. 1b promootori transkripti osakaal on suurem kuues ajuosas: haistesibulas, parietaalkoores, väikeajus, ajusillas ja seljaajus. 1a transkripti esineb rohkem frontaalkoores, temporaalkoores, striatumis, septumis, hipokampuses, taalamuses, hüpotaalamuses ja piklikajus. Suuremad erinevused 1a ja 1b promootorite ekspressioonis esinevad haistesibulas, frontaalkoores, hipokampuses ja väikeajus. Kuklakoores ja septumis esineb praktiliselt võrdne suhe 1a ja 1b promootorite ekspressioonis.

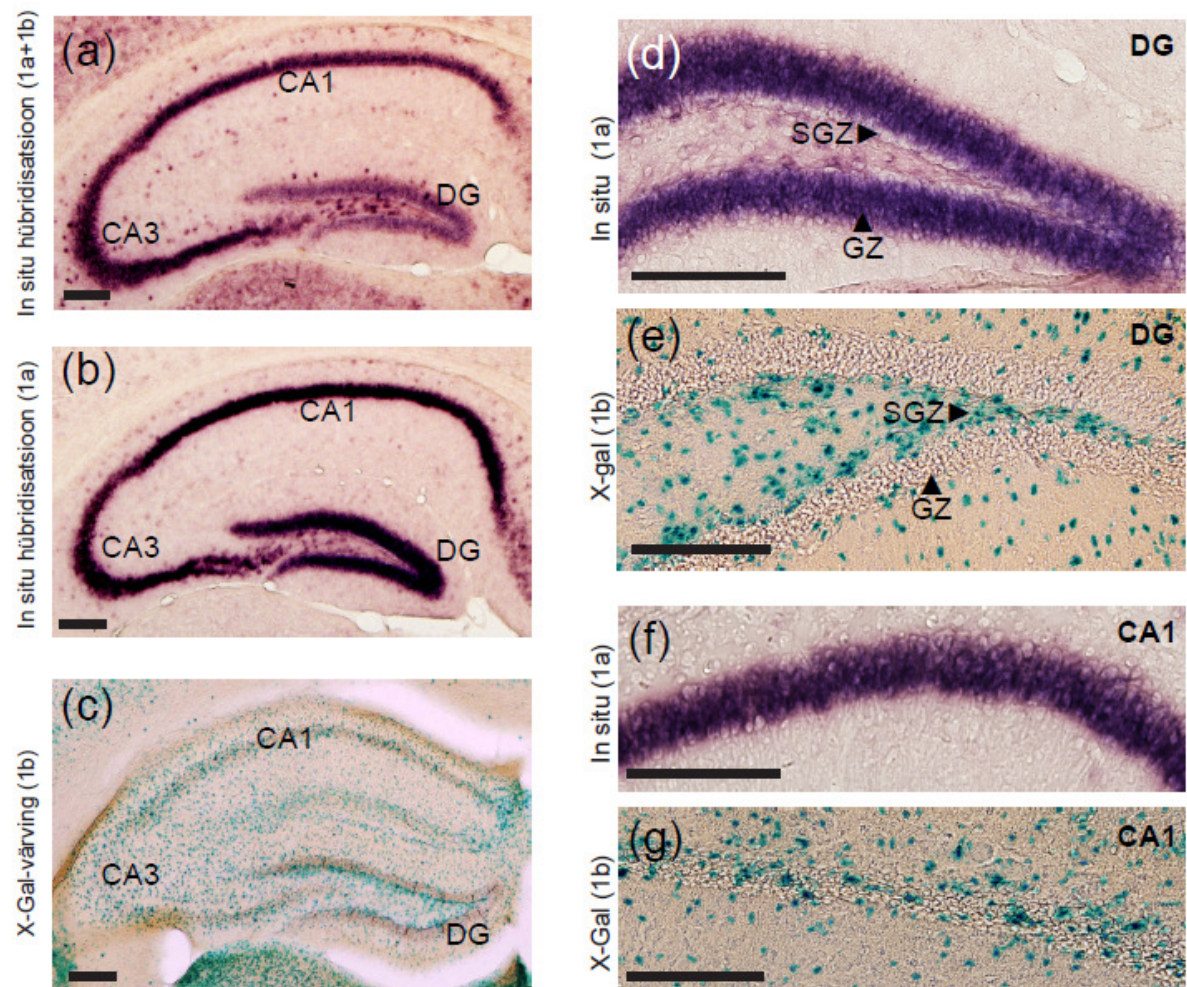
Mitteneuraalsetest kudedest ekspresseerub *Lsamp* rohkem silmas, südames ja testises. Silmas on tuvastatav nii 1a kui 1b promootori transkriptide ekspressioon. 1a ekspressioon on silmas märkimisväärselt kõrgem kui 1b ekspressioon. Südames ekspresseerub vaid 1b promootori transkript. Testises ekspresseerub samuti spetsiifiliselt just 1b transkript. Väga õrna ekspressiooni taset võib näha ka neeru, kopsu ja peensoole puhul. Kopsus esineb ainult 1b transkript ja 1a puudub. Maksa puhul ei esinenud kummagi transkripti ekspressiooni (joonis 6).



Joonis 6. *Lsamp* geeni promootorite 1a ja 1b transkriptide ekspressioon neuraalsetes (A) ja mitteneuraalsetes (B) kudedes. 1b ekspressioon tähistatud valgete tulpadega, 1a ekspressioon mustade tulpadega. Andmed on esitatud keskmiste ekspressiooni väärtustena koos keskmise standardveaga (+SEM).

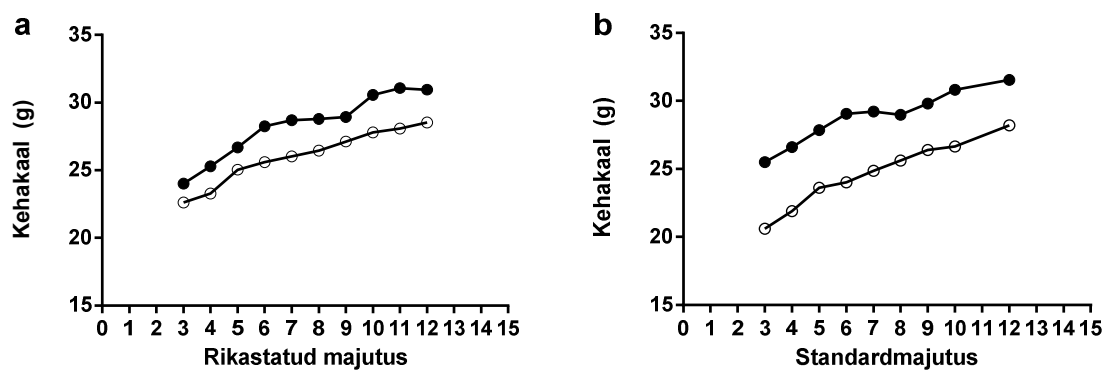
2.3.2 *Lsamp* 1a ja 1b promootorite aktiivsuse muster hipokampuses

Hipokampuse hammaskääru granulaarses rakkude kihis on tuvastatav tugev *Lsamp* geeni 1a promootori aktiivsus. Subgranulaarses tsoonis, mis on ka neurogeneesi toimumise kohaks, on aktiivne *Lsamp* 1b promootor. Hipokampuse CA1 piirkonna püramidaalrakkudele on spetsiifiline 1a promootori transkripti ekspressioon. 1b transkripti ekspressioon on selles piirkonnas tunduvalt nõrgem ja hajusam, st esineb üksikutes rakkudes (joonis 7).



Joonis 7. *Lsamp* 1a ja 1b promootorite ekspressioon hipokampuse (a, b, c) hammaskäarus (d, e) ja CA1 piirkonna püramidaalrakkude kihis (f, g). Skaalajoon 200 µm.

2.3.3 Hiirte areng rikastatud- ja standardmajutuses

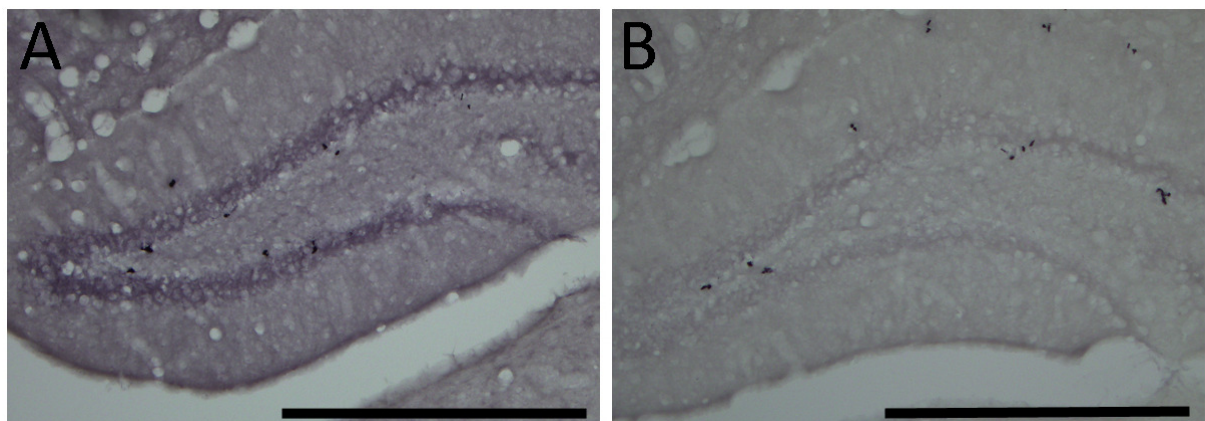


Joonis 8. *Lsamp* puudulike ning metsiktüüpi hiirte kehakaalu võrdlus (a) rikastatud- ja (b) standardmajutuses. Mustad ringid: metsiktüüpi hiired; valged ringid: *Lsamp*^{-/-} hiired.

Katseloomade kaalumiskatse tulemused näitavad kehakaalu sõltuvust genotüübist. Nii rikastatud- kui ka standard majutuses elavate geenipuudulike ja metsiktüüpi hiirte vahel on näha kasvuerinevusi. Mõlemas keskkonnas kasvanud *Lsmp* puudulikud hiired on võrreldes metsiktüüpi hiirtega väiksema kehakaaluga. Samas aga nende kasvude vahe väheneb rikastatud majutuses kasvavate hiirte vahel ning on suurem standardmajutuses kasvavate hiirte vahel (joonis 8).

2.3.4 BrdU meetodi optimeerimine

Lsmp-puudulikkusega hiirte hipokampaalse neurogeneesi iseloomustamiseks alustasime BrdU meetodi optimeerimist. Erinevate protokollide variatsioonide puhul ilmnis iga kord, et taust on liiga tugev ja spetsiifiline signaal liiga nõrk või taustast täiesti eristamatu. Lõpuks õnnestus Tartu Ülikooli Farmakoloogia osakonnast (dr Külli Jaakolt) saadud kontroll-lõikudel eelpool toodud protokollide järgi tehtud katses rotis tehtud primaarse antikehaga BrdU-d sisaldavaid rakke näha ning nõrgem signaal ka meie lõikudel tuvastada. Ilma primaarse antikehata tehtud katses selgus, et tugevat tausta värvust põhjustas hobuses tehtud hiire IgG vastane antikeha. Samas ei töötanud meie katses ka hiire tehtud BrdU vastane antikeha, kuna sellega ei õnnestunud signaali näha ühegi protokollide variatsiooniga. Katse jaoks osutusid sobivaks kombinatsioonid rotis tehtud BrdU vastase antikeha ja eeslis või küülikus tehtud roti IgG vastase antikeha vahel (joonis 9).



Joonis 9. 1. meetod - BrdU värving kasutades ABC Kit'i; 2. töötlemata wt hiirte hipokampuse koronaallõik (st mitte enrichitud). Primaarne antikeha on rotis tehtud BrdU vastane antikeha, A – eeslis tehtud roti IgG vastane sekundaarne antikeha, B – küülikus tehtud roti IgG vastane sekundaarne antikeha. Skaalajoon 500 µm.

2.4 Arutelu

Lsamp promootorite ekspressioon oli tuvastatav kõigis katse jaoks valitud ajuosades.

Varasemalt on teada, et *Lsamp* promootor 1a transkriptsiooniline aktiivsus avaldub limbilistes struktuurides, mille funktsioonideks on emotsioonid ja motivatsioon (Philips jt, 2014). Meie tehtud katsetulemused langevad sellega kokku ning 1a promootori transkriptide ekspressioon on suurem frontaalkoores, temporaalkoores ja amügdalas, striatumis, septumis, hipokampus, taalamuses ja hüpotaalamuses. Promootori 1b transkriptide ekspressioon on spetsiifilisem sensoorsete juhteteede puhul, milleks on kuulmise ja nägemisega seotud ning somatosensoorne piirkond. Kuigi haistesibulas, mis on limbilise süsteemi osa, on aktiivne ka 1a promootor, ent 1b promootori poolt algatatud transkripti ekspressioon on märkimisväärselt tugevam. See võib olla tingitud asjaolust, et haistmistajuga seotud ajupiirkonnad kattuvad emotsioonidega seotud ajupiirkondadega (Gutman jt, 2013). Kõige tugevam 1b aktiivsus esineb väikeajus ning kõige madalama *Lsamp* ekspressiooni tasemega neuraalne kude on piklikaju.

Organite puhul on *Lsamp* ekspressioonitase väga madal ning kõik katse jaoks valitud koed tulemusi ei andnud. Organitest on kõige tugevam *Lsamp* ekspressioon silmas, südames ja testises. Silmas dominantselt ekspresseeruva promootor 1a ekspressioonitase on võrreldav ekspressiooni intensiivsusega ajuosades. Tõenäoliselt on seletuseks see, et ka silmas leidub neuraalseid rakke. Ootamatu on aga 1a kõrgem ning 1b suhteliselt madalam aktiivsus silmas, kuigi 1b on seniste tulemuste alusel peamiselt seostunud sensoorsete süsteemidega. Südames ekspresseerub ainult promootor 1b ning testises on spetsiifiliselt aktiivne 1b promootor. Neerus, kopsus ning peensooles on mõlema promootori aktiivsus väga madal ning maksas ei õnnestunud *Lsamp* ekspressioonitaset tuvastada. *Lsamp* erinevate transkriptide ekspressiooni organites ei ole varem näidatud. Hiire organitest on küll tehtud western blot analüüsi, kuid organites (neerus ja maksas) on immunoloogiliste meetoditega saadud *Lsamp*-negatiivne tulemus (Innos jt, 2011). Tõenäoliselt on *Lsamp* ekspressioon mitteneuraalsetes kudedes nii madala koopiaarvuga, et enamik meetodeid ei ole selle tuvastamiseks piisavalt tundlikud. Meie saadud tulemuste põhjal avaldub *Lsamp* ekspressioon neerus mõlema promootori kaudu. *Lsamp* madal 1a ja 1b ekspressioon neerus on seletatav *Lsamp*'i tuumorsupressori rolliga neerukartsinoomi puhul (Chen jt, 2003). *Lsamp* 1b teiste organitega võrreldes märkimisväärselt kõrgem tase südames langeb kokku varasemate leidudega, mis on viidanud *Lsamp* osalusele aterosklerootiliste muutuste kujunemisel (Vance jt, 2007).

Organi- ja koespetsiifilise *Lsamp* geeni ekspressiooni tagab 1a ja 1b eksoneid eraldav 1,6 Mb intron, mis sisaldab ilmselt koespetsiifilisi regulaatorseid alasid (Pimenta ja Levitt, 2004).

Reaalaja-PCRi tulemused näitasid, et hipokampuses on aktiivsed nii *Lsamp* 1a kui ka 1b promootorid, kuid 1a transkripti ekspressioon on märkimisväärselt suurem. Seda tulemust toetasid ka hipokampuse *Lsamp* 1a ning 1b promootorite ekspressioonist tehtud pildid. Fotodelt ilmneb, et 1a promootori intensiivne ekspressioon on iseloomulik hipokampuse C1 piikonna püramidaalrakkudele ja hammaskääru granulaarrakkude kihile ning 1b promootorit ekspresseeritakse peamiselt subgranulaarses tsoonis (joonis 7). Kuna uute neuronite juurdekasv toimub subgranulaarses tsoonis, võib tehtud piltide põhjal oletada, et hipokampaalse neurogeneesi aspektist võib olla olulise tähtsusega just *Lsamp* 1b promootor. CA1-CA3 püramidaalkihis on 1b värving tuvastatav hajusalt, üksikutes rakkudes.

Meie tehtud kehakaalu mõõtmised langevad kokku varem tehtud katsetega. Innos jt (2011) näitasid samuti, et *Lsamp*-puudulikud hiired on väiksema kehakaaluga võrreldes metsiktüüpi pesakaaslastega. Selline kaalude erinevus esineb nii rikastatud keskkonnas kui ka standardmajutuses elavate hiirte puhul. Tehtud katsed näitavad, et kehakaal on sõltuvuses genotüübist.

Kuna käesolevast tööst ilmnes *Lsamp* geeni alternatiivsete promootorite väga spetsiifiline regulatsioon hipokampuse erinevates osades ning varasemalt on teada, et *Lsamp* mõlema promootori ekspressioon tõuseb rikastatud keskkonnas spetsiifiliselt just hipokampuses, oli meie viimaseks suuremaks eesmärgiks uurida, kas *Lsamp*-puudulikkusega hiirtel on muutusi neurogeneesis. BrdU meetodi optimeerimisel leiti meetodi osas kirjeldatud protokolliga erinevate variatsioonide katsetamisel sobilikud antikehad. Sobilikuks primaarseks antikehaks on rotis tehtud BrdU vastane antikeha markeering ning sekundaarseks antikehaks on eeslis või küülikus tehtud roti IgG vastased antikehade markeeringud. Antud meetodi edukas optimeerimine võimaldab läbi viia edaspidiseid uuringuid LSAMP valgu osaluse tuvastamiseks neurogeneesis.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärk oli kirjeldada *Lsamp* geeni üldist ekspressioonimustrit hiire organismis, spetsiifilisemat anatoomilist ekspressioonimustrit hipokampuses ning alustada optimeerimistööd, et järgnevalt uurida *Lsamp* geeni osalust neurogeneesis. *Lsamp* üldise ekspressioonimustri kirjeldamiseks valiti välja 15 ajuosa ning 7 organit, mis kvantifitseeriti reaallaja-PCRi kasutades. *Lsamp* promootorite spetsiifilisema ekspressioonimustri kirjeldamiseks tehti detailsed, suure resolutsiooniga pildid hipokampuse erinevatest piirkondadest. *Lsamp* geeni osaluse väljaselgitamiseks neurogeneesis, viidi läbi BrdU meetodi optimeerimine, mis baseerub rakkude replikatsiooni visualiseerimisel, kasutades BrdU molekuli ning antikeha värvingut.

Töö tulemused võib lühidalt kokku võtta järgnevalt

- *Lsamp* geeni ekspressioon on tuvastatav kõikides katseks valitud neuraalsetes kudedes: haistesibulas, frontaalkoores, parietaalkoores, amügdalas, kuklakoores, striatumis, septumis, hipokampuses, taalamuses, hüpotaalamuses, väikeajus, ajusillas, piklikajus ja seljaajus ning ekspressioonide tasemed on kooskõlas Füsioloogia instituudis varem teiste meetoditega saadud andmetega. Organitest oli ekspressioon tuvastatav silmas, südames ja testises. Erinevates organites on *Lsamp* promootorite aktiivsus erinev ning igas koes on promootorite ekspressioonisuhe erinev.
- Hipokampuses domineerib *Lsamp* 1a promootorist lähtuv ekspressioon. Hammaskääru subgranulaarses tsoonis on aktiivne 1b promootor, granulaarses rakkude kihis ja C1 piirkonna püramidaalrakkudes ekspresseerub tugevamini 1a promootor.
- *Lsamp*-puudulikkusega hiirtega ja metsiktüüpi hiirtega tehtud kaalumiskatsed näitavad kehakaalu sõltuvust genotüübist. BrdU meetodile leiti optimeerimise katsetes sobilikud antikehad.

Tulemused näitavad *Lsamp* geeni promootorite 1a ja 1b erinevat ekspressioonimustrit neuraalsetes ning mitteneuraalsetes kudedes. *Lsamp* ekspressiooni mitteneuraalsetes kudedes pole varem kirjeldatud ning seega pakub käesolev bakalaureusetöö huvitavaid seni kirjeldamata tulemusi. BrdU meetodi edukas optimeerimine võimaldab meil järgnevalt alustada tööd LSAMP valgu osaluse lähema uurimisega neurogeneesis.

Potential involvement of LSAMP protein in hippocampal neurogenesis

Maria Piirsalu

SUMMARY

Adult neurogenesis is a process of generating functional neurons from adult neural precursors. Neurogenesis occurs throughout life in restricted brain regions in rodents: the subgranular zone (SGZ) in the dentate gyrus of the hippocampus and the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles, where new neurons are generated and then migrate through the rostral migratory stream (RMS) to the olfactory bulb to become interneurons. Interestingly in humans neuroblasts generated in the lateral ventricle wall do not migrate via RMS to olfactory bulb but instead go to striatum (Ernst et.al., 2014).

Adult hippocampal neurogenesis is associated with neural plasticity which allows the brain to adapt to injury and changing environmental conditions (Freund et.al., 2013). Exposure to an enriched environment and physical activity, such as voluntary running, increases hippocampal neurogenesis (van Praag et.al., 2000). Furthermore limbic system-associated membrane protein (LSAMP), a neural cell adhesion molecule, has been shown to increase synaptogenesis in the hippocampal neurogenesis (Hashimoto et.al., 2009). Previous studies performed in the University of Tartu in department of physiology have indicated that the level of mRNA of the *Lsamp* gene in the hippocampus is higher in mice living in enriched environment compared to the mice living in standard- or individual housing. The expression of *Lsamp* 1a and 1b transcripts in hippocampus is higher in mice living in enriched- and standard housing. In addition Qiu et.al. (2010) showed that *Lsamp*-deficient mice have altered synaptic transmission and impaired plasticity in adult hippocampus.

Thus we decided to firstly describe the general expression pattern of *Lsamp* gene in mouse model, secondly to describe specific anatomical expression pattern of *Lsamp* gene in hippocampus and lastly to optimize BrdU method which allows the following study of detecting the participation of *Lsamp* gene in neurogenesis. In addition we also measured the body weight of the *Lsamp*-deficient and wildtype mice in enriched and standard environment. To describe the general expression pattern of *Lsamp* we selected 15 brain parts and 7 organs and examined them by quantitative real-time-PCR, both exons amplified

separately. For the description of specific anatomical expression of *Lsamp* promoters we made detailed high resolution photos of the hippocampus. The body weight data was collected weekly from 3 weeks of age until 12 weeks of age. The BrdU method which is based on the visualisation of replicating cells by the use of BrdU molecule and antibody staining was successfully optimized.

The results of the current work can be summarized as follows

- The *Lsamp* gene expression can be detected in all neural tissues selected for this study: olfactory bulb, frontal cortex, parietal cortex, amygdala, occipital cortex, striatum, septum, hippocampus, thalamus, hypothalamus, cerebellum, pons, medulla and spinal cord. *Lsamp* expression in organs can be detected mainly in eye, heart and testis. *Lsamp* expression level differs in different brain parts and organs. Also the expression rate of *Lsamp* promoters 1a and 1b is different in each tissue.
- The expression of 1a transcript is dominant in hippocampus. 1b promoter is active in dentate gyrus subgranular zone. 1a promoter is expressed intensively in granular cell layer and C1 pyramidal cells.
- In standard housing, body weight was significantly dependent on genotype. The body weight of *Lsamp*-deficient mice was much smaller than in wildtype littermates. In enrichment housing, body weight was also dependent on genotypes, but interestingly the difference was much smaller than in standard housing mice. Thanks to the successful optimization, we found suitable antibodies and their optimal quantities for BrdU method.

Our results confirm that *Lsamp* expression is regulated by use of alternative promoters in neural and non-neural tissues. The results of real-time PCR study in neural tissues are in line with previous study results showing that 1a transcript is specifically expressed in the brain areas that are commonly considered to be limbic structures and 1b transcript is specifically expressed in sensory pathways (Philips et.al., 2014). The expression of *Lsamp* in non-neural tissues has not been studied before and thus current thesis provides interesting and previously undescribed results. Successful optimization of BrdU method allows us to perform a following study of detecting the participation of *Lsamp* gene in neurogenesis.

TÄNUAVALDUSED

Eelkõige soovin tänada oma juhendajaid, Mari-Anne Philipsit ja Kersti Lillevälja, meisterliku lõputöö juhendamise ja abi ning nõuannete eest. Tänan doktoranti Triin Tekkot, kes õpetas mind hiire ajast külmlõike tegema ning tema abivalmiduse eest BrdU meetodi optimeerimisel. Samuti tänan magistranti Taavi Vanaveskit, kes õpetas mind reaalaaja-PCR reaktsiooni läbi viima ning tema abi eest tulemuste analüüsimisel.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Artiklid

Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., Daszuta, A. (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*. 29(3): 450-60

Barkho, B. Z., Song, H., Aimone, J. B., Smrt, R.D., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Zhao, X. (2006). Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells. Dev.* 15, 407-421.

Behan, A. T., Byrne, C., Dunn, M. J., Cagney, G., Cotter, D.R. (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol. Psychiatry*. 14: 601–613.

Bergmann, O., Liebl, J., Bernard, S., Alkass, K., Yeung, M.S., Steier, P., Kutschera, W., Johnson, L., Lande´n, M., Druid, H. (2012). The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 74, 634–639.

Brown, J., Cooper-Kuhn, C.M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F.H., Kuhn, G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 17: 2042-6

Chen, J., Lui, W.O., Vos, M.D., Clark, G.J., Takahashi, M., Schoumans, J. (2003). The t(1;3)breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas. *Cancer Cell* 4: 405–413.

Chojnacki, A., Shimazaki, T., Gregg, C., Weinmaster, G., Weiss, S. (2003). Glycoprotein 130 signaling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* 23, 1730–1741.

- Ditlevsen, D.K., Povlsen, G.K., Berezin, V., Bock, E. (2008). NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci.* 86:727–743.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021–1034.
- Ekdahl, C.T., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2009). Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neuroscience* 158, 1021-1029.
- Ernst, E., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., Frisen, J. (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156(5):1072-83.
- Flanagan, F.A., Rebaza, L.M., Derzic, S., Schwartz, P.H., Monuki, E.S. (2006) Regulation of human precursor cells by laminin and integrins. *J Neurosci Res* 83:845-856.
- Freund, J., Brandmaier, A. M., Lewejohann, L., Kriste, I., Kritzler, M., Krüger, A., Sachser, N., Lindenberger, U., Kempermann, G. (2013) Emergence of individuality in genetically identical mice. *Science.* 340: 756-759.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54, 559-566.
- Ge, S., Yang, C.H, Hsu, K.S., Ming, G.L., Song, H. (2008). Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J. Physiol.* 586, 3759-3765.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 481-488.
- Gutman, D.A., Magnuson, M., Majeed, W., Keifer, O.P. Jr., Davis, M., Ressler, K.J., Keilholz, S. (2013) Mapping of the mouse olfactory system with manganese-enhanced magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging. *Brain Struct Funct* 218(2):527–537
- Göritz, C., Frisen, J. (2012). Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell Stem Cell* 10, 657–659.

Hashimoto, T., Maekawa, S., Miyata, S. (2009). IgLON cell adhesion molecules regulate synaptogenesis in hippocampal neurons. *Cell Biochem. Funct.* 27: 496–498.

Haydar, T.F., Wang, F., Schwartz, M.L., Rakic, P. (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci.* 20(15): 5764-74

Heimer, L., Van Hoesen, G.W. (2006) The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 30(2):126–147

Hitoshi, S., Seaberg, R.M., Kosciuk, C., Alexson, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Tsuji, S., van der Kooy, D. (2004). Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev.* 18, 1806–1811.

Hortsch, M. (2000). Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* 15:1–10

Innos J, Philips MA, Leidmaa E, Heinla I, Raud S, Reemann P, Plaas M, Nurk K, Kurrikoff K, Matto V, Visnapuu T, Mardi P, Kõks S, Vasar E (2011). Lower anxiety and a decrease in agonistic behaviour in *Lsamp*-deficient mice. *Behav Brain Res*, 217(1), 21–31.

Innos, J., Philips, M.-A., Raud, S., Lilleväli, K., Kõks, S., Vasar, E. (2012). Deletion of the *Lsamp* gene lowers sensitivity to stressful environmental manipulations in mice. *Behav. Brain Res.* 228:74-81.

Kaneko, N., Marin, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H. (2010). New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 67, 213-223.

Kippin, T.E., Kapur, S., van der Kooy, D. (2005). Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci.* 25(24): 5815-23

Knoth, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R.P., Horvat, V., Volk, B., Kempermann, G. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS ONE* 5, e8809.

Kojima, T., Hirota, Y., Ema, M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H., Sawamoto, K. (2010). Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells* 28, 545-554.

Koido, K., Traks, T., Balõtshev, R., Eller, T., Must, A., Maron, E. (2012). Associations between LSAMP gene polymorphisms and major depressive disorder and panic disorder. *Transl Psychiatry* 2: e152.

Koido K, Janno S, Traks T, Parksepp M, Ljubajev Ü, Veiksaar P, Must A, Shlik J, Vasar V, Vasar E (2014). Associations between polymorphisms of LSAMP gene and schizophrenia. *Psychiatry Res*, 30;215(3): 797-798.

Kraev, I., Henneberger, C., Rossetti, C., Conboy, L., Kohler, L.B., Fantin, M., Jennings, A., Venero, C., Popov, V., Rusakov, D. (2011) A peptide mimetic targeting trans-homophilic NCAM binding sites promotes spatial learning and neural plasticity in the hippocampus. *PloS One*, 6:e23433.

Kresse, S.H., Ohnstad, H.O., Paulsen, E.B., Bjerkehagen, B., Shuzai, K., Serra, M. (2009). LSAMP, a novel candidate tumor suppressor gene in human osteosarcomas, identified by array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 679–693.

Kuo, C.T., Mirzadeh, Z., Soriano-Navarro, M., Rasin, M., Wang, D., Shen, J., Sesta, N., Garcia-Verdugo, J., Alvarez-Buylla, A., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (2006). Postnatal deletion of Numb/Numbl like reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche. *Cell* 127, 1253-1264.

Kühn, M.W., Radtke, I., Bullinger, L., Goorha, S., Cheng, J., Edelmann, J. (2012). High-resolution genomic profiling of adult and pediatric core-binding factor acute myeloid leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*, 119(10): e67–75.

- Lemkine, G.F., Raj, A., Alfama, G., Turque, N., Hassani, Z., Alegria-Prevot, O., Samarut, J., Levi, G., Demeneix, B.A. (2005). Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J.* 19, 863–865.
- Leventhal, C., Rafii, S., Rafii, D., Shahar, A., Goldman, S.A. (1999). Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol. Cell. Neurosci.* 13, 450-464.
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrra, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.
- Linheng, L., Xie, T. (2005). Stem Cell Niche: Structure and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21: 605-31.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408
- Lledo, P.M., Alonso M., Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 179-193.
- Lo Turco, J.J., Owens, D.F., Heath, M.J., Davis, M.B., Kriegstein, A.R. (1997) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron.* 15(6): 1287-98
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.
- Ma, D.K., Jang, M.H., Guo, J.U., Ming, G.L., Gage, F.H., Song, H. (2010). Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 13, 1338-1334.
- Marin, O. And Rubenstein, J.L.R. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 441-83.

Nagayama, S., Takahashi, Y.K., Yoshihara, Y., Mori, K. (2004). Mitral and Tufted Cells Differ in the Decoding Manner of Odor Maps in the Rat Olfactory Bulb. *J Neurophysiol.* 91(6): 2532-40

Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 425, 470-494.

Philips, M-A., Lilleväli, K., Heinla, I., Luuk, H., Hundahl, C.A., Kongi, K., Vanaveski, T., Tekko, T., Innos, J., Vasar, E. (2014). Lsamp is implicated in the regulation of emotional and social behavior by use of alternative promoters in the brain. *Brain Struct Funct.*

Pimenta, A.F., Levitt, P. (2004). Characterization of the genomic structure of the mouse limbic system-associated membrane protein (Lsamp) gene. *Genomics.* 83:790-801.

Pimenta A.F., Zhukareva, V., Barbe M.F., Reinoso B.S., Grimley C., Henzel, W., Fischer, I., Levitt, P. (1995) The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron* 15:287-97.

Qiu, S., Champagne, D.L., Peters, M., Catania, E.H., Weeber, E.J., Levitt, P., Pimenta, A.F. (2010). Loss of limbic system-associated membrane protein leads to reduced hippocampal mineralocorticoid receptor expression, impaired synaptic plasticity, and spatial memory deficit. *Biol. Psychiatry.* 68(2):197-204.

Raud S, Sütt S, Luuk H, Plaas M, Innos J, Kõks S, Vasar E (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice. *Neurosci Lett*, 460(2): 138-142

Riquelme, P.A., Drapeau, E., Doetsch, F. (2008). Brain micro-ecologies: Neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 123-137.

Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.M. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382–386.

Schachner, M. (1989). Families of neural adhesion molecules. *Ciba Found Symp* 145:156–69.

Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S. (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299, 117–120

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostroöm, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–1227.

Stummer, W., Baethmann, A., Murr, R., Schurere, L. & Kempfski, O. S. Cerebral protection against ischemia by locomotor activity in gerbils: underlying mechanisms. *Stroke* 26, 1423–1430 (1995).

Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Jr., Ming, G.L., Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 3-11.

Zheng, W., Nowakowski, R.S., Vaccarino, F.M. (2004). Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev. Neurosci.* 26, 181–196.

Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S.J., Luskin, M.B. (1998). Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci.* 11:234-45.

Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 7:619-27.

Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci.* 19:5792-801.

Toshio Kosaka ja Katsuko Kosaka (2005). Structural Organization of the Glomerulus in the Main Olfactory Bulb. *Chem Senses.* 1:i107-8.

Vance et al. (2007) Lsamp gene associated with cardiovascular disease. U.S. Patent 2007/0148661 A1 Pub.Date: Jun. 28, 2007.

Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1(3): 191-198.

Wojcik-Stanaszek, L., Gregor, A., Zalewska, T. (2011). Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins. *Acta Neurobiol Exp* 71:103-12.

Yang, P., Baker, K.A., Hagg, T. (2005). A disintegrin and metalloprotease 21 (ADAM21) is associated with neurogenesis and axonal growth in developing and adult rodent CNS. *J Comp Neurol.* 490(2): 163-79.

B) Raamat

Franklin K., Paxinos G. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, Academic Press.

Kärner, J. (1997). *Sissejuhatus arengubioloogiasse*. P. 122. Tartu Ülikooli kirjastuse trükikoda. Tartu.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Maria Piirsalu
(sünnikuupäev: 28.09.1988)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„Lsamp valgu võimalik osalus hipokampusega seotud neurogeneesis“,
mille juhendajad on Kersti Lilleväli ja Mari-Anne Philips,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **05.26.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014